DOI:10.11931/guihaia.gxzw201801032

[1]用单性结实基因 *2A11-iaaM* 转化罗汉果的研究

周琼[1]，胡姗姗[1]，郝庆林[1]，莫燕梅[1]，李刚[2*]，唐美琼[2]，辛佳佳[1]，宁弋珍[1]
（1. 广西大学 农学院，南宁 530004；2. 广西药用植物园，广西药用资源保护与遗传改良重点实验室，南宁 530023）

摘 要 为实现罗汉果生产中免除人工授粉和果实无籽化，本试验利用 pBI121-Gus，构建果实特异启动子 *2A11* 与生长素合成相关基因 *iaaM* 的嵌合基因（*2A11-iaaM*）过量表达载体；以罗汉果雌株叶盘为材料，采用农杆菌介导法，研究和建立罗汉果高效遗传转化体系，转化和创制单性结实罗汉果种质；并通过基因特异引物对的 PCR 扩增，初步检测出转基因阳性植株，将之移栽大田，观察转基因植株的单性结实性的表现。结果：成功构建了罗汉果单性结实性相关的 pBAI-Gus 植物双元表达载体；建立了农杆菌介导的罗汉果叶盘遗传转化优化体系，即农杆菌菌液 OD600 值为 0.3~0.5，侵染 10 min，最优选择培养基为 MS+TDZ/0.7 mg·L^{-1}+IBA/0.5 mg·L^{-1}+Kan/5 mg·L^{-1}+Cef/300 mg·L^{-1}；经 PCR 鉴定共获得 4 株转基因阳性雌株；将阳性植株扩繁后移栽田间，经田间调查发现，24 株阳性扩繁植株中有 5 株正常开花，占总植株数的 20.8%，且其子房未经人工授粉发育成的幼果，表现单性结实性。本试验在载体构建和农杆菌介导的罗汉果遗传转化体系优化的基础上，将外源单性结实相关嵌合基因整合进罗汉果基因组并得到表达，为后续研究单性结实罗汉果的遗传生理创制转基因罗汉果单性结实新种质，以及克服其产业化中需要人工授粉和无籽化提供了理论和应用基础。

关键词 罗汉果，单性结实，转基因，遗传转化

Transformation of *Siraitia grosvenorii* with *2A11-iaaM* gene

Zhou Qiong[1]，Hu Shan-Shan[1]，Hao Qing-Lin[1]，Mo Yan-Mei[1]，Li Gang[2*]，
Tang Mei-Qiong[2]，Xin Jia-Jia[1]，Ning Yi-Zhen[1]
（1. College of Agricultural, Guangxi University, Nanning 530004, China；2. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

Abstract An enormous amount of effort goes into artificial pollination and seeds processing of *Siraitia grosvenorii*, which is limiting the producing cost, the development and utilization, and the industrialization of *Siraitia grosvenorii*. To solve the seeds and artificial pollination problems of *Siraitia grosvenorii*, the study used pBI121-Gus to construct chimeric expression vector (*pBI121-2A11-iaaM-Gus*) with fruit specific promoter *2A11* and auxin synthesis key enzyme tryptophan monooxygenase enzyme gene *iaaM*. We took leaf disc of female plants as explants to research the antibiotics sensitivity, the impact of bacteriostatic in different concentration of Agrobacterium EHA105, and the different microbial infection times, to establish an efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation system of *Siraitia grosvenorii*, and create the parthenocarpy germplasm of *Siraitia grosvenorii*. The gene specific primers were designed, then the positive plants were detected by PCR technique and transplanted into the field, while recorded the hereditary characters of the transgenic plants. The results showed that the chimeric expression vector (PBI121-2A11-iaaM-Gus) related to parthenocarpy character of *Siraitia grosvenorii* was successfully constructed. And the Agrobacterium-mediated genetic transformation system of *Siraitia grosvenorii* leaf disc was established. The optimal concentration of infection of Agrobacterium tumefaciens was the OD600 value 0.3~0.5, while the optimal infection time was 10 min. And the optimal selective medium was with 5 mg·L^{-1} kanamycin and 300 mg·L^{-1} cefotaxime sodium. PCR results showed that 4 female plants of *Siraitia grosvenorii* were tested positive. Propagating the 4 positive female plants in the plant tissue culture room and

---

1基金项目：国家自然科学基金（31260359）；广西大学博士启动项目（XBZ110586）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260359)；Startup Foundation for Doctors of Guangxi University (XBZ110586)]。

作者简介：周琼（1967-），女，重庆人，高级实验师，研究方向为植物发育生物学，（E-mail）qiong9857@126.com。
通信作者：李刚，博士，副研究员，主要从事药用植物遗传育种研究，（E-mail）lggxu07@hotmail.com。

transplanting the propagated 24 positive female plants to the field. Then the field investigation showed that there were 5 female plants flowering normally with a proportion of 20.8%, and the *Siraitia grosvenorii* young fruits which had not been artificial pollinated were observed, which suggested the parthenocarpy character was expressed. The study based on expression vector construction and the Agrobacterium-mediated genetic transformation system of *Siraitia grosvenorii*, integrating the exogenetic parthenocarpy gene into the *Siraitia grosvenorii* genome and was preliminarily expressed. The study also laid a foundation for the subsequent study of the genetic physiology, the creation of the transgenosis parthenocarpy germplasm of *Siraitia grosvenorii*, and solving the seeds and artificial pollination problems of *Siraitia grosvenorii*.
Keywords *Siraitia grosvenorii*, parthenocarpy, transgenosis, genetic transformation

中药材罗汉果 (Siraitiae Fructus) 是葫芦科多年生宿根性攀援藤本植物罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 的干燥果实，具有提神生津、清热润肺、止咳定喘、滑肠通便等效用，是我国特有的药用和甜料经济作物，第一、二批均被国家卫生部、中医药管理局列为药食同源品种（国家药典委员会，2015；李锋等，2010；张维等，2014）。现代药理、毒理研究表明，罗汉果具有抗炎、抗病毒、抗癌、抗氧化、免疫调节、保护肝脏、降低血脂等多种作用，却无毒副作用。罗汉果果实主要有效成份为葫芦烷四环三萜皂苷，以甜苷V含量最高，约占总皂苷含量的20%，是世界上最强的非糖甜味物质之一，是罗汉果甜苷，万分之一浓度时为5%蔗糖甜度的425

，高甜、低热、天然、保健，具有广阔的开发前景和市场空间（Li et al，2014；秦莹莹和李啸红，2012）。

但是，罗汉果具有雌雄异株的发育生物学特点，且花粉粘重而不利于风媒传粉，野生大黑蜂减少而影响栽培品种的虫媒传粉，所以，栽培生产中，需要大量人工授粉，才能获得经济效益，而自然条件下罗汉果花粉寿命短，通常需要在开花当天上午完成授粉，劳动成本高，因此，罗汉果栽培生产中迫切需要解决“如何免除人工授粉”的难题。此外，罗汉果的种子中不含甜苷而含有大量的种油，不仅影响口感，又增加了提取纯化的难度以及加工成本。虽然已有三倍体无籽罗汉果研究的报道，但因果实小、生长期短等原因，迄今尚无可应用于生产的三倍体优良品种。因此，如何免除人工授粉和实现果实无籽化，是罗汉果产业化发展中亟待解决的技术难题。

单性结实是指子房不经受精而形成无籽果实的现象，与生长素信号、或赤霉素信号途径等有关（刘迪等，2008）。单性结实植株体具有结实率高、品质优良、无籽果实、无畸形果、可稳定遗传等优势，是食用、加工和生产中追求的重要目标（Pandolfini et al，2002；毛自朝等，2002）。除了自然存在的可遗传的单性结实以外，还可以通过激素诱导、转基因技术等获得单性结实。在雌花开花的当天利用2,4-D涂抹罗汉果子房壁，也可刺激子房膨大，每隔8~10 d涂一次，共2~3次，还可得到与人工授粉大小相等的单性结实果实（李珍贞和邬辉平，1988）。但激素处理技术要求较高，浓度难以控制，容易产生畸形果，需要较多劳动者力，还存在激素残留影响健康，故生产上不宜推广采用。培育单性结实罗汉果新种质不仅能克服其生产中迫切需要解决的人工授粉的主要难题，也能解决授粉会带来果实有籽的难题，是罗汉果产业化发展和育种的最佳选择和热点前沿。

运用基因工程的方法，转入与内源激素代谢或信号转导相关的基因来诱导单性结实，从而获得无籽果实，已经成为植物遗传工程的主要手段，在番茄、茄子、草莓、树莓和甜瓜等物种中获得转基因单性结实植株，但还没有关于罗汉果转基因单性结实的报道（陶炼，2013）。*2A11* 启动子是来源于番茄的果实

特异性表达启动子，具有良好的驱动外源基因组织特异性表达的启动子活性（Van Haaren & Catherine，1991；林炳英等，2006）。*iaaM* 基因主要来源于根癌农杆菌和假单孢菌，编码色氨酸单加氧酶，可利用色氨酸合成吲哚乙酸，从而提高生长素含量，将 *iaaM* 与子房或幼果特异启动子组成的嵌合基因导入植物体中，使用其在开花期和果实发育早期表达，可诱导茄子、番茄等以果实为主要收获对象的植物的单性结实。（荆风雪，2013；Rotino et al，1997；Ficcadenti et al，1999）。

本研究拟在植物双元表达载体 pBI121-Gus 基础上，构建 *2A11-iaaM* 的过量表达载体，利用叶盘转化法，研究农杆菌介导的罗汉果遗传转化体系，创制转基因单性结实罗汉果雌性种质，为深入其遗传生理研究、品种培育等提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料与处理

实验材料取自种植于广西药用植物园实验基地的已开花的罗汉果雌株，选取幼嫩带有腋芽的罗汉果茎段，用 75%酒精消毒 30 s，0.1% $HgCl_2$ 消毒 10 min，无菌蒸馏水冲洗 5 次，之后用无菌滤纸吸干茎段表面水分，并将茎段接种于 MS 培养基中，置于恒温光照培养箱进行组织培养，设置温度为 25 ℃，光照强度为 2 000 lx，光照时间为 12 $h \cdot d^{-1}$。由此获得的罗汉果无菌苗用于后续遗传转化实验。

本实验载体构建及遗传转化所用 *pBI121-Gus* 植物双元表达载体、含 *pMD-2A11* 克隆子的大肠杆菌、含 *pMD-iaaM* 克隆子的大肠杆菌、根癌农杆菌 *EHA105* 均由广西药用植物园李刚副研究员提供。其中，*2A11* 和 *iaaM* 分别是从樱桃番茄总 DNA 中克隆的果实特异启动子和从根癌农杆菌 C58 菌株 DNA 中克隆的生长素合素相关酶基因，启动子 *2A11* 上、下游特异性引物分别引入限制性核酸内切酶 *Hin*dIII 和 *Xba*I 酶切位点，经目标基因、载体等核酸序列分析，于 *iaaM* 基因上、下游特异性引物分别引入限制性核酸内切酶 *Xba*I 和 XmaI 酶切位点（如表 1）。前述各菌液（加少量甘油）保存于-80 ℃冰箱。

1.1.2 实验试剂和仪器

实验试剂：胰蛋白胨、酵母提取物、蔗糖、琼脂、MS 培养基（不含蔗糖）、6-BA、IBA、TDZ、NAA、乙酰丁香酮、头孢霉素、利福平、卡那霉素、氯仿、异戊醇、CTAB、PVP、β-巯基乙醇、质粒 DNA 小量抽提试剂盒等均购自上海生工；pMD™19-T simple vector、限制性核酸内切酶 *Xba*I、*XmaI*、*Hin*dIII 和 Taq™ 购自 Takara 和 Thermo；2×Es Taq MasterMix（含染料）购自北京康为世纪；引物合成及核酸测序由华大基因公司完成。

实验仪器：移液枪（Eppendorf），高速冷冻离心机（湘仪，TGL-16M），PCR 仪（BIO RAD，T100 Thermal Cycler），电泳仪（DYY-10C），（经济型）双人单面垂直净化工作台（SW-CJ-2D），振荡培养箱（上海知楚，ZQZY-HC），电热恒温培养箱（上海跃进，HH-B11·420S），高压灭菌锅（ZEALWAY，G180T），数显恒温水浴锅（金坛市盛威实验仪器厂）、紫外分光光度计等。

1.1.3 培养基

选择培养基：MS+TDZ/0.7 $mg \cdot L^{-1}$+IBA/0.5 $mg \cdot L^{-1}$+Kan/5 $mg \cdot L^{-1}$+Cef/300 $mg \cdot L^{-1}$；愈伤组织诱导培养基：MS+TDZ/0.7 $mg \cdot L^{-1}$+IBA/0.5 $mg \cdot L^{-1}$；愈伤组织分化培养基：MS+TDZ/0.7 $mg \cdot L^{-1}$+IBA/0.5 $mg \cdot L^{-1}$+$GA_3$0.5 $mg \cdot L^{-1}$+芸苔素内酯/0.5 $mg \cdot L^{-1}$；

不定芽增殖培养基：MS+6-BA/0.5 mg·L^{-1}+IBA/0.2 mg·L^{-1}；生根培养基：MS+NAA/0.5 mg·L^{-1}+IBA/0.2 mg·L^{-1}。

1.1.4 实验所用引物

表 1 本实验中用到的所有引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	序列（5'-3'） Sequence(5'-3')
AI1F	GGCTTTACACTTTATGCTTCCG
AI1R	CACTTCCTGATTATTGACCCACA
2A11 F	GAAAGAGATTATGAAGGCG
2A11 R	TAGATGTAAGCGGAGAGGG
iaaM F	CTTACGAGAAAGGCACGAC
iaaM R	TAGATGCTGGGCAAACG
AI CF	AACACTTTCCCTTAAACATC
AI CR	ATTTCCTTGCCAACATAG

1.2 嵌合表达载体 *pBI121-2A11-iaaM* 的构建

1.2.1 载体和目的片段质粒提取

将保存于-80 ℃冰箱的 *pBI121-Gus* 菌液接种到含 Kan 50 μg·mL^{-1} 的 LB 液体培养基中，37 ℃恒温，200 rpm 过夜振荡培养。用无菌接种环在超净工作台挑取上述菌液，并于含 Kan 50 μg·mL^{-1} 的 LB 固体培养基上划线培养得出单菌落。用无菌枪头挑取单菌落进行扩大培养。*pMD-2A11* 和 *pMD-iaaM* 菌液的扩大培养方法同上，其中 LB 培养基中加入的抗生素和抗生素浓度为 Amp 50 μg·mL^{-1}。按照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒（Sangon）说明书对上述扩大培养后的菌液进行质粒抽提，并取 3 μL 质粒 DNA 样品用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，观察质粒 DNA 提取的质量及完整性，用超微量紫外分光光度计测定 DNA 的浓度及纯度。

1.2.2 *pBI121-Gus* 与 *2A11* 的连接

由于 *iaaM* 基因序列内含 *Hin*dIII 限制性酶切位点，所以载体构建中，先连接启动子 *2A11*，再连接目的基因 *iaaM*。

pMD-2A11 质粒和 *pBI121-Gus* 质粒双酶切反应使用 *Xba*I 和 *Hin*dIII 限制性内切酶，反应条件为 37 ℃ 2 h，酶切反应体系见表 2。将上述酶切反应产物分别进行切胶回收目的片段和载体片段，并检测回收片段的质量和浓度。配制连接反应体系：10×T4 DNA Ligase Buffer 2.5 μL，目的基因 4.5 μL，载体 1.5 μL，T4 DNA Ligase(350 U·μL^{-1}) 1.5 μL，加水至总体积 20 μL，16 ℃水浴连接过夜。

将连接产物转化 DH5α 感受态细胞，常规涂板于含有 IPTG、X-gal 和的 Kan（50 μg·mL^{-1}）的 LB 固体平板培养基上（按《分子克隆》中相应说明操作），培养过夜，随机挑取转化平板的白色单菌落于加有 Kan 50μg/mL 的 LB 液体培养基上中，37 ℃恒温，200 r·min^{-1} 摇床培养过夜；通过菌液 PCR 鉴定阳性克隆，将阳性克隆的菌斑提取质粒，酶切检测再次确定阳性克隆菌斑，得到具有目的基因的中间表达载体 *pBI121-2A11*。

表 2 *pMD-2A11* 和 *pBI121-Gus* 质粒双酶切反应体系
Table 2 The double enzyme reaction system of *pMD-2A11* and *pBI121-Gus* plasmid

反应体系 Reaction system	加入的量（μL） Add quantity
10×M Buffer	2
*Xba*I	1
*Hin*dIII	1
0.1% BSA	2
pBI121-Gus/ *pMD-2A11*	4

Nuclease-free water	10

1.2.3 *iaaM* 和中间载体 *pBI121-2A11* 的连接

pMD-iaaM 质粒和 *pBI121-2A11* 质粒双酶切反应使用 *Xba*I 和 *XmaI* 限制性内切酶，反应温度条件为 37 ℃，反应体系见表 3，连接方法同 1.2.2。得到嵌合表达载体 *pBI121-2A11-iaaM*。设计引物对（跨启动子和目的基因全长）AI1F 和 AI1R，用于后续 PCR 检测。采用 AI1F 和 AI1R 引物对一次性扩增出包含 *2A11* 和 *iaaM* 基因的序列，做 T 克隆，送去华大基因测序公司测序，测序所得序列在 GenBank 数据库进行 Blast 比对、分析，证实无误后用于后续实验。

表 3 *pMD-iaaM* 和 *pBI-2A11* 质粒双酶切反应体系

Table 3 The double enzyme reaction system of *pMD-iaaM* and *pBI-2A11* plasmid

反应体系 Reaction system	加入的量（μL） Add quantity
10×M Buffer	2
*Xba*I	1
XmaI	1
0.1% BSA	2
pBI121-2A11/ *pMD-iaaM*	3
Nuclease-free water	11

1.3 遗传转化体系的优化

1.3.1 抗生素 Kan 敏感性试验

分别配制含有不同浓度 Kan（0、2、4、6、8、10、13、16、20、30 mg·L^{-1}）的愈伤组织诱导培养基，将预培养 4 d 的罗汉果叶盘进行接种，每个试验接种 8 瓶，每瓶接种 10 个叶盘。置于恒温光照培养箱，设置培养条件为：温度 25 ℃, 光照强度 2 000 lx，光照时间 12 h·d^{-1}，培养 25 d 后记录叶盘生长情况。

1.3.2 抗生素 Cef 抑菌试验

分别配制含有不同浓度 Cef（0、50、100、200、300、400、500 mg·L^{-1}）的愈伤组织诱导培养基，将经过相同预培养和共培养操作的罗汉果叶盘用无菌水清洗以后进行接种，每个试验接种 8 瓶，每瓶接种 10 个叶盘。置于恒温光照培养箱，设置培养条件为：温度 25 ℃, 光照强度 2 000 lx，光照时间 12 h·d^{-1}，培养两周后记录叶盘生长情况。

1.3.3 农杆菌侵染菌液浓度的确立

取 3 mL 振荡培养后的农杆菌菌液，于紫外分光光度计下测定 OD600 值，并稀释为不同 OD600（0.1、0.3、0.5、0.7）的菌液，分别对预培养 4 d 的罗汉果叶盘进行相同时间的侵染，将侵染后的叶盘接种至愈伤组织诱导培养基（含 100 μmol As），每个试验接种 3 瓶，每瓶接种 20 个叶盘。置于黑暗条件下共培养 3 d 后，进行选择培养，设置培养条件为：温度 25 ℃, 光照强度 2 000 lx，光照时间 12 h·d^{-1}，培养两周后记录叶盘生长情况。

1.3.4 农杆菌侵染时间的确立

用相同浓度的农杆菌菌液对预培养 4 d 的罗汉果叶盘进行侵染，侵染时间分别为 5、10、15、20、25 min，将侵染后的叶盘接种至愈伤组织诱导培养基（含 100 μmol AS），每个试验接种 3 瓶，每瓶接种 20 个叶盘。置于黑暗条件下共培养 3d 后，进行选择培养，设置培养条件为：温度 25 ℃, 光照强度 2 000 lx，光照时间 12 h·d^{-1}，培养两周后记录叶盘生长情况。

1.4 *pBI121-2A11-iaaM* 基因对罗汉果的转化

1.4.1 罗汉果雌株叶盘的准备与预培养

将罗汉果雌株无菌叶片用灭过菌的打孔器打出直径约 0.5 cm 的小圆片，划伤叶背面及叶脉，接种在叶片愈伤组织诱导培养基上，并使伤口充分接触培养

基表面。黑暗条件下预培养 4 天，直至叶盘周边表现卷曲、上翘、膨大并产生颗粒状愈伤。

1.4.2 载体菌液准备

从－80 ℃冰箱取出已转入 *pBI121-2A11-iaaM* 基因的农杆菌菌液，在附加 Kan 50 μg·mL^{-1}、rif 20 μg·mL^{-1} 的 YEB 固体平板上进行划线，28 ℃培养 48 h；挑取单菌落，接种到 10 mL 附加 Kan 50 μg·mL^{-1}、rif 20 μg·mL^{-1} 的 YEB 液体培养基中，28 ℃，200 rpm 振荡培养 48 h；取上述菌液 1 mL 加入 50 mL 新配制的无抗生素的 YEB 液体培养基，同时加入 100 μmol 的 AS，28 ℃，200 rpm 培养 6 h 左右，使得菌液 OD600 为 0.3~0.5 时即可用于侵染。

1.4.3 侵染

于超净工作台上，将预培养 4 天的罗汉果叶盘接种到上述准备的载体菌液中，28 ℃，150 rpm 浸泡 10 min；迅速取出叶盘并用无菌滤纸吸去附着的菌液；将侵染过的罗汉果叶盘接种在叶片愈伤组织诱导培养基（含 100 μmol 的 AS）上，黑暗条件下共培养 3 d。

1.4.4 选择培养

用无菌水清洗经过共培养的罗汉果叶盘，无菌滤纸吸干后接种到叶片愈伤组织诱导培养基（含 Kan 5 mg·L^{-1}、Cef 300 mg·L^{-1}）上，光照条件下进行选择培养；将经过选择培养两周后的罗汉果叶盘用无菌水清洗后，接种到叶片愈伤组织分化培养基（含 Kan 5 mg·L^{-1}、Cef 100 mg·L^{-1}）上，光照条件下进行继代选择培养，直至开始分化产生不定芽。

1.4.5 不定芽增殖培养

将经过继代选择培养后产生不定芽的愈伤组织转接至含 Kan 5 mg·L^{-1}、Cef 100 mg·L^{-1} 的不定芽增殖培养基，光照条件下进行培养。

1.4.6 生根培养

待不定芽长到 2 cm 以上时，切下并插入含 Kan 5 mg·L^{-1}、Cef 100 mg·L^{-1} 的生根培养基，光照条件下进行培养，约两周左右长出不定根。

1.5 分子检测

采用 CTAB 法微量提取已生出不定根的植株的部分茎叶，利用设计出的特异引物（表 1）扩增目的片段。PCR 扩增反应体系为：0.5 μL DNA，5 μL 2×Es Taq MasterMix，0.4 μL 引物 F/R，加水至总体系 10 μL。PCR 扩增反应条件为：94 ℃ 4 min；94 ℃ 30 s，55~60 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，进行 30 个循环；72 ℃ 8~10 min；4 ℃保存。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测，并在凝胶成像系统中成像。

本实验设计了三套特异引物共同用于 PCR 扩增检测转基因阳性植株（表 1），目的在于提高 PCR 检测阳性植株的准确性，使检测结果更具可靠性。其中，2A11 F/R 是针对果实特异启动子 *2A11* 序列设计的特异引物；iaaM F/R 是针对单性结实基因 *iaaM* 序列设计的特异引物；AI CF/R 是同时跨部分目的基因和部分启动子序列设计的特异引物。

1.6 田间调查

将经过 PCR 检测呈阳性的拟转基因植株进行扩繁，生根之后于网室大棚环境中炼苗 5~7 d，再转移至营养钵中生长 20 d 左右，使得组培苗充分适应外界环境条件，之后移栽大棚，观察记录性状表现。

2 结果与分析

2.1 *pBI121-Gus* 与 *2A11* 的连接

选择 *Hin*dIII 和 *Xba*I 分别对 *pBI121-Gus* 和 pMD-*2A11* 进行酶切，分别切去 *pBI121-Gus* 的 *CaMV35S* 启动子回收大片段线性化植物双元表达载体，切去 pMD T 载体回收小片段 *2A11*，将 *2A11* 连接进 *pBI121-Gus* 载体后的图谱见图 1。其中，*2A11* 质粒的双酶切结果得出 1 300 bp 左右的目的片段和 2 700 bp 左右的 pMD 19 T simple vector 片段(图 2)。将 *2A11* 与线性化 *pBI121-Gus* 连接后，转化感受态大肠杆菌 DH5α，涂板，在蓝白筛选平板上挑取 8 个菌斑，经过 PCR 检测（图 3），这 8 个菌斑全为阳性，选择 1，2，3 号菌斑做双酶切验证，结果均为阳性。

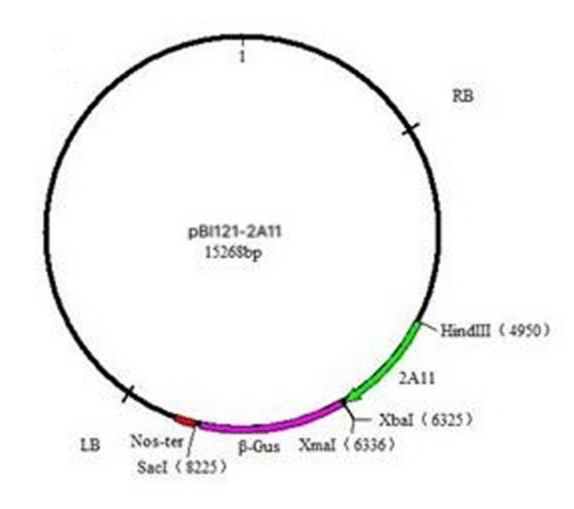


图 1 *pBI121-2A11* 图谱
Fig. 1 The atlas of *pBI121-2A11*

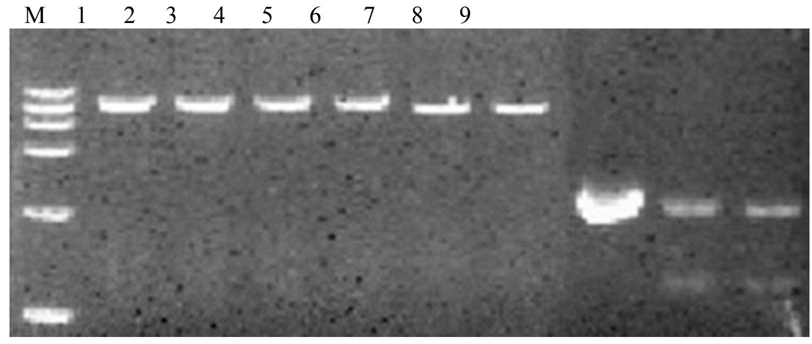


图 2 *pBI121-Gus* 和 *2A11* 质粒双酶切结果
注：M：DL 15 000 DNA Marker；1-6：*pBI121-Gus* 的双酶切；7：*2A11* 质粒对照；8-9：*2A11* 双酶切
Fig. 2 The double enzyme results of *pBI121-Gus* and *2A11*
Note: DL 15 000 DNA Marker； 1-6：Double enzyme of *pBI121-Gus*; 7：Plasmid of *2A11*; 8-9：Double enzyme of *2A11*

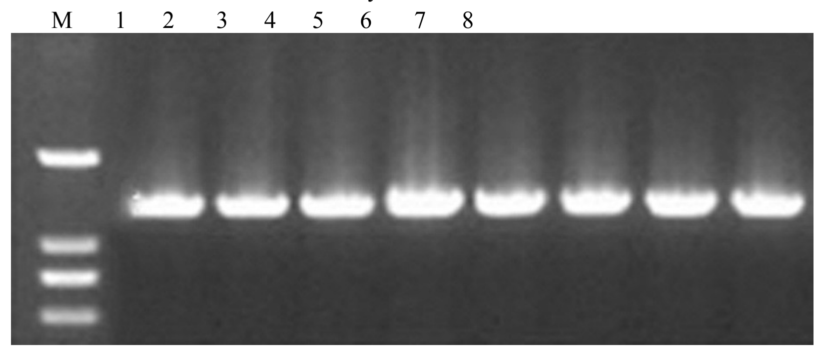


图 3 *pBI121-Gus* 与 *2A11* 重组质粒 PCR 检测
注：M：DL 2 000 DNA Marker；1-8：重组质粒菌斑
Fig. 3 The PCR detection of recombinant plasmid of *pBI121-Gus* and *2A11*
Note: M：DL 2 000 DNA Marker；1-8：Recombinant plasmid plaque

2.2 *iaaM* 和中间载体 *pBI121-2A11* 的连接

iaaM 基因与中间载体 *pBI121-2A11* 连接转化后挑取 8 个菌斑，经过 PCR 检测和双酶切验证得出 2 个阳性菌斑。测序所得序列在 GenBank 数据库进行 Blast 比对，结果显示启动子片段 *2A11* 基因序列和目标基因片段 *iaaM* 基因序列与已报道的 *2A11* 和 *iaaM* 基因序列，同源性都为 99%，可编码相应蛋白序列。最终构建好的嵌合载体 *pBI121-2A11-iaaM* 图谱见图 4。

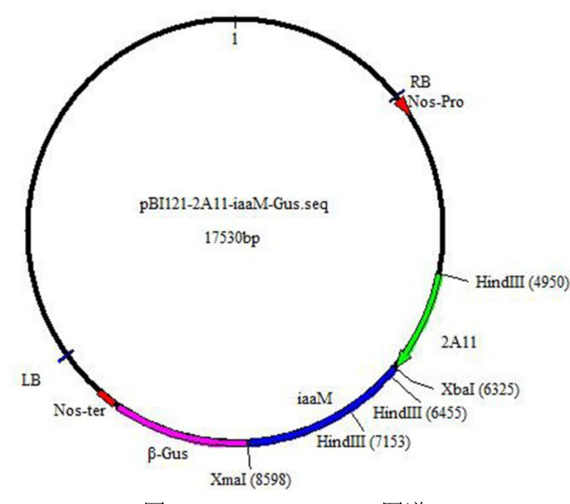


图 4 *pBI121-2A11-iaaM* 图谱
Fig. 4 The atlas of *pBI121-2A11-iaaM*

2.3 抗生素 Kan 敏感性试验

罗汉果叶盘对抗生素 Kan 的敏感性试验结果如表 4，可见，罗汉果叶盘的持绿率和出芽率随着 Kan 浓度的增加而降低，同时芽的分化和生长也随之缓慢直至停止萎蔫。罗汉果叶盘的持绿率自 Kan 浓度高于 4 mg·L^{-1} 起开始下降，而出芽率在 Kan 浓度低于 6 mg·L^{-1} 时均维持在较高水平，过高的 Kan 浓度会影响转化细胞的正常生长分化，浓度过低又难以起到筛选作用，由此可判断，罗汉果叶盘分化出芽过程对抗生素 Kan 的选择压为 5 mg·L^{-1}。

表 4 罗汉果叶盘对抗生素 Kan 的敏感性试验
Table 4 *Siraitia grosvenorii* leaf-disc sensitivity to Kan

Kan 浓度 Kan concentration (mg·L^{-1})	持绿率 Green rate (%)	出芽率 Bud rate (%)
0	100	100
2	100	96.25
4	100	88.75
6	95	85
8	87.5	73.75
10	77.5	62.5
13	41.5	33.75
16	13.75	0
20	5	0
30	0	0

2.4 抗生素 Cef 抑菌试验

由表 5 可知，罗汉果叶盘的污染率和出芽率随着 cef 浓度的增加而降低，且 Cef 的浓度为 300~500 mg·L^{-1} 时，污染率为 0，抑菌效果最佳，同时在此浓度范围内，Cef 浓度为 300 mg·L^{-1} 时，罗汉果叶盘的出芽率相对较高。过低的 Cef 浓度难以抑菌，过高的 Cef 浓度又会抑制出芽，由此可判断，抗生素 Cef 抑制罗汉果叶盘感染农杆菌的最佳浓度为 300 mg·L^{-1}。

表 5 抗生素 Cef 对农杆菌的抑制试验
Table 5 Agrobacterium inhibition test of Cef

Cef浓度 Cef concentration (mg·L[-1])	污染率 Contamination rate (%)	出芽率 Bud rate (%)
0	100	0
50	100	83.75
100	77.5	75
200	33.75	70
300	0	63.75
400	0	43.75
500	0	0

2.5 农杆菌侵染菌液浓度的确立

由表 6 可知，罗汉果叶盘的污染率随着农杆菌菌液浓度的增加而升高，同时罗汉果叶盘的出芽率随着农杆菌菌液浓度的增加而降低。过高的农杆菌菌液浓度（OD600=0.7），会导致罗汉果叶盘污染严重，不能分化出芽；过低的农杆菌菌液浓度（OD600=0.1），则会影响转化的效率。由此可判断，农杆菌用于侵染时的菌液 OD600 值最好为 0.3~0.5。

表 6 农杆菌菌液浓度对出芽率的影响
Table 6 Effects on Agrobacterium concentration to budding rate

菌液浓度 Agrobacterium concentration (OD600 value)	污染率 Contamination rate (%)	出芽率 Bud rate (%)
0.1	20.3	96.5
0.3	38.5	81.25
0.5	41.3	53.5
0.7	78.5	0

2.6 农杆菌侵染时间的确立

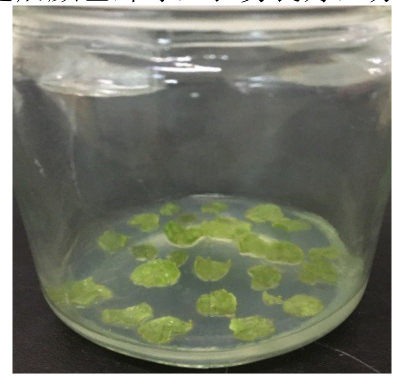
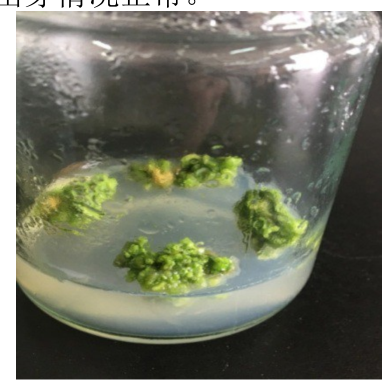
由表 7 可知，罗汉果叶盘的污染率随农杆菌侵染时间的增加而升高，同时罗汉果叶盘的出芽率随农杆菌侵染时间的增加而降低。当农杆菌侵染时间超过 15 min，会导致罗汉果叶盘污染严重，不能分化出芽；而农杆菌侵染时间过短，又会影响遗传转化的效率。由此可判断，农杆菌用于侵染时的最佳时间为 10 min。

表 7 农杆菌侵染时间对罗汉果叶盘的影响
Table 7 Effects on Agrobacterium infection time to *Siraitia grosvenorii* leaf-disc

侵染时间 Infection time (min)	污染率 Contamination rate (%)	出芽率 Bud rate (%)
5	10.8	93.25
10	15	87.5
15	36.7	35.8
20	61.5	0
25	83.2	0

2.7 罗汉果叶盘的再生组织培养

图 5 显示了罗汉果叶盘经侵染之后的共培养情况、愈伤组织诱导情况、分化出芽情况以及生根培养情况。调查统计发现，在已优化罗汉果遗传转化体系的基础上，对罗汉果叶盘进行农杆菌转化及后续组织培养，可以看出罗汉果叶盘侵染之后颜色鲜绿，长势良好，分化出芽情况正常。

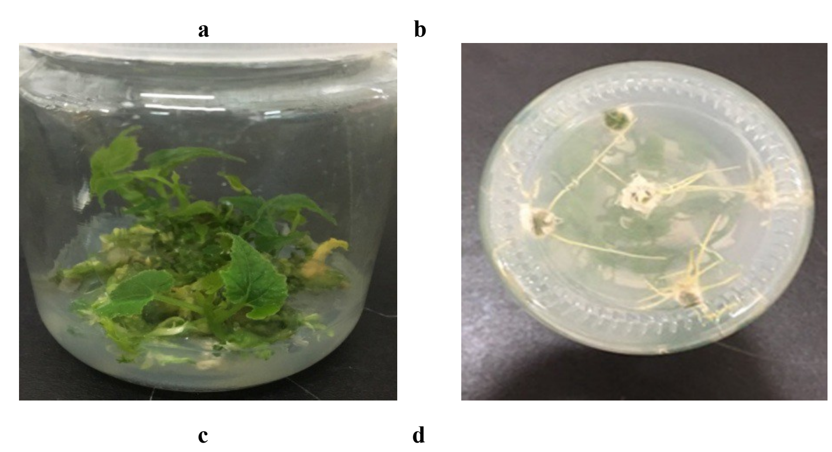


图 5 罗汉果叶盘的再生组织培养

注：a.罗汉果叶盘与农杆菌共培养；b.罗汉果叶盘诱导出愈伤组织；c.罗汉果叶盘愈伤组织分化出芽；d.罗汉果不定芽生根情况

Fig. 5 Tissue culture of *Siraitia grosvenorii* leaf-disc

Note: a. *Siraitia grosvenorii* leaf-disc cultivation with Agrobacterium；b. Induct *Siraitia grosvenorii* leaf-disc to callus；c. *Siraitia grosvenorii* leaf-disc callus differentiate into buds；d. *Siraitia grosvenorii* adventitious bud rooting

2.8 转化植株的分子检测

经过农杆菌介导转化和抗性培养基筛选培养，共得到 15 个抗性芽，转接至生根培养基培养 30 d 后，采用 CTAB 法微量提取植株部分茎叶 DNA，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，结果如图 6 所示。根据特异引物（表 1）进行 PCR 检测扩增目的片段，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，综合三套特异引物的检测结果，结果显示共有 4 株转化植株扩增出目的条带（图 7）。

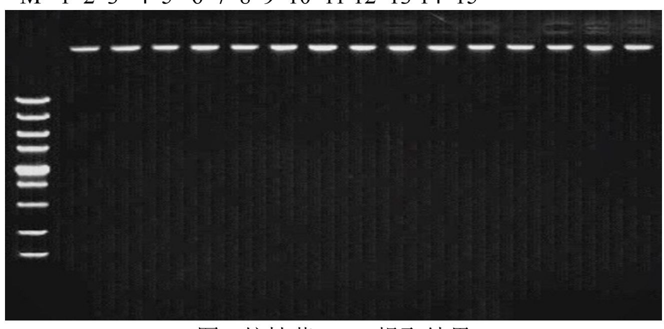
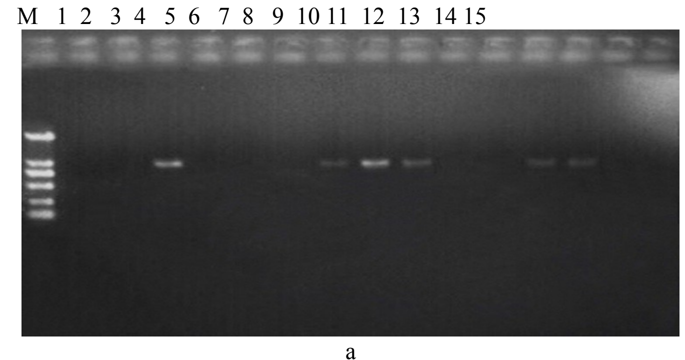


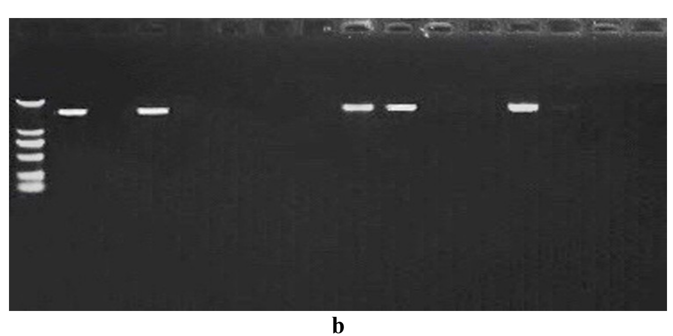
图 6 抗性芽 DNA 提取结果

注：M：DL 5 000 Marker；1-15：植株编号

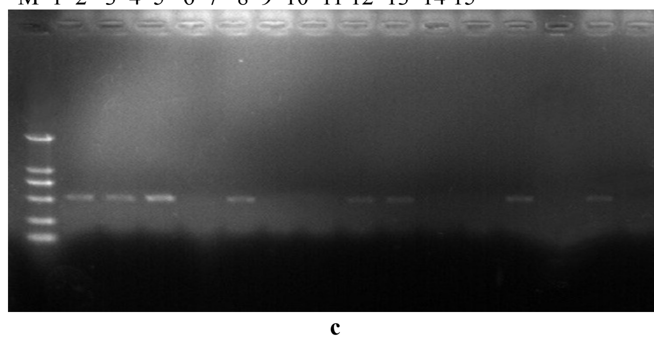
Fig.6 DNA extraction results

Note: M: DL 5 000 Marker; 1-15: Plants number





b



c

图 7 PCR 检测结果

注：M：DL 2 000 Marker；1-15：植株编号；a.由特异引物对 2A11 F/R 检测；b.由特异引物对 iaaM F/R 检测；c.由特异引物对 AI CF/R 检测

Fig.7 PCR detection results

Note: M: DL 2 000 Marker; 1-15: Plants number; a. Detection by specific primer 2A11 F/R; b. Detection by specific primer iaaM F/R; c. Detection by specific primer AI CF/R

2.9 田间调查

将 PCR 检测呈阳性的拟转基因植株扩繁生根后移栽大棚，观察记录性状表现。结果显示，扩繁之后的 24 株拟转基因阳性植株在营养生长时期长势良好，叶色鲜绿，叶型正常。在开花期有 5 株拟转基因植株正常开花，占总植株数的 20.8%，且开花植株的子房在挂果期未经授粉即发育成果实，表现单性结实性。对转基因单性结实的罗汉果果实和正常人工授粉得到的罗汉果果实，在果实发育 75 d 后分别随机取样 10 个，统计果实的横径、纵径、重量以及种子情况（表 8），果实的纵剖手工切片照片见图 8。结果显示，转基因单性结实果实比正常人工授粉果实具有果形小、种子数极少且不具种仁等特点。有关转基因单性结实果实发育品质的形成、遗传生理规律以及大量转化苗的鉴定、筛选工作仍在进一步的研究之中。

表 8 转基因单性结实果实与人工授粉果实有关性状的比较

Table8 Comparison of characters between transgenic parthenocarpic fruit and artificial pollinated fruit

果实类型 Fruit types	果实横径 Equatorial diameter (cm)	果实纵径 Longitudinal diameter (cm)	单果重 Weight per fruit (g)	种子数量 Seed number
转基因单性结实果实 Transgenic parthenocarpic fruit	4.09±0.13	3.97±0.14	6.03±0.37	7±6
人工授粉果实 Artificial pollinated fruit	5.41±0.18	5.53±0.29	20.57±0.52	44±10

a b a b



图 8 果实纵剖手工切片图
注：a.正常人工授粉的罗汉果果实；b.转基因单性结实的罗汉果果实
Fig.8 Longitudinal section of fruit
Note: a. Artificial pollinated fruit；b. Transgenic parthenocarpic fruit

3 讨论

本试验将嵌合有果实特异启动子 *2A11* 与生长素合成相关基因 *iaaM* 连入 pBI121-Gus，成功构建了 pBI121-2A11-iaaM-Gus 过量表达载体。并建立和优化了根癌农杆菌介导的以罗汉果叶片为受体的遗传转化体系。即以预培养 4 d 的罗汉果叶盘接种到 OD600 值为 0.3~0.5，含 100 μmol 的 AS 的农杆菌菌液中，侵染 10 min，迅速取出叶盘并用无菌滤纸吸去附着的菌液；将侵染过的罗汉果叶盘接种在叶片愈伤组织诱导培养基（含 100 μmol 的 AS）上，黑暗条件下共培养 3 d；选择培养基为：MS+TDZ/0.7 mg·L^{-1}+IBA/0.5 mg·L^{-1}+Kan/5 mg·L^{-1}+Cef/300 mg·L^{-1}。然后，经过不定芽增殖、壮苗培养后，进行分子鉴定。

前期受体预实验表明，罗汉果种子苗胚轴可经过体细胞胚性愈伤发生途径成苗，但因性别鉴定困难，所以采用罗汉果雌株叶片为受体。叶盘转化法是 Horsch et al 建立的一种简便有效的植物遗传转化方法，最高转化频率可达 15%，是目前双子叶植物较为常用的转化技术，但得到的转化体有可能是嵌合体（王蕾，2007）。罗汉果叶片经胚性愈伤发生途径成苗困难，所以，遗传转化后采用器官发生途径直接成苗，转化后的植株多细胞起源，存在嵌合现象，为此，实验中采用分子生物学技术进行两次鉴定，即在对增殖芽第一次鉴定后，取芽尖扩增，再进行第二次鉴定。PCR 扩增技术作为一种快捷、灵敏的基因检测方法，能够简便有效地确定已整合进外源基因的植株，但 PCR 的检测结果容

易出现假阳性。为获得更可靠的实验结果，本试验在对转化植株进行 PCR 检测时，同时使用了 *2A11*、*iaaM* 以及跨 *2A11* 和 *iaaM* 部分序列的嵌合基因的三套特异引物进行检测。

根据经验，自然条件下若无人工辅助授粉，栽培罗汉果极少因虫媒或风媒等原因结出果实，通常被认为与栽培罗汉果蜜腺退化、大黑蜂减少、花粉粘重等因素有关；但严谨起见，为防止罗汉果开花期间虫媒或风媒传粉的干扰，实验安排将经过分子鉴定为阳性的拟转基因植株种植于孔径 1 毫米见方的网室大棚中，且仅种有罗汉果雌株（附近没有罗汉果雄株），既从源头上杜绝了罗汉果雄花花粉来源，也在一定程度上防止了昆虫传授异源花粉引起的干扰。

经分子鉴定所得转基因罗汉果阳性植株株，部分正常开花，并不经授粉而长成小果，由于 T0 代转基因罗汉果受病毒影响较重，转入基因的表达、其内源激素含量、单性结实性等可能受到影响。利用单性结实品种，由于不需要种植雄株以提供花粉，可以增加单位面积上雌株的植株数而提高产量。单性结实品种能克服低温、弱光、授粉困难等，具有较强的适应性和种植范围，果实使用加工方便，市场前景好（Hazra & Dutta，2010；Yan，2010；Shabtai，2007）。研究表明，转基因单性结实番茄果实的品质没有异常变化（Rotino，2005），利用 CPPU 诱导的甜瓜单性结实果实中蔗糖和果糖比有籽果中含量高（LI，2011）。单性结实基本代谢谱没有改变，是其结构、风味和营养没有显著变化的主要原因（Picone，2011）。转基因单性结实罗汉果的单性结实性、品质、产量、适应性、次生代谢等表现如何尚有待进一步研究。

参考文献

FICCADENTI N， SESTILI S， PANDOLFINI T， et al， 1999. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato [J]. Mol Breeding，5(5)：463-470.

HAZRA P，DUTTA AK，2010. Expression of parthenocarpy in tomato due to temperature and pollination treatment [J]. International Journal of Vegetable Science，16(3)：222-232.

HORSCH RB， FRY JE， HOFFMAN NL， et al， 1985. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. Science，227:1229-1231.

JING FX， 2013. *iaaM* gene transformation of Artemisia Artemisia and its influence on the development of glandular hair [D]. Changsha： Hunan Agricultural University. [荆风雪. 2013. *iaaM* 基因转化黄花蒿及其对腺毛发育的影响[D]. 长沙：湖南农业大学]

LI C，LIN L，SUI F，et al，2014. Chemistry and pharmacology of *Siraitia grosvenorii*： A review [J]. Chin J Nat Med，12(2)：89-102.

LI F， JIANG SY， LI DP， 2010. Study on Cultivation and chemistry of Grosvenor [M]. Nanning：Guangxi science and Technology Press：1-244. [李锋，蒋水元，李典鹏，2010. 罗汉果栽培与化学研究[M]. 南宁：广西科学技术出版社：1-244.]

LI X X，2011. Chlorophenoxyacetic acid and chloropyridylphenylurea accelerate translocation of photoassimilates to parthenocarpic and seeded fruits of muskmelon (Cucumis melo) [J]. J Plant Physiol，168(9)：920-926.

LI ZZ， WU HP， 1988. 2， 4-D and Fructus grosvenori single parthenogenetic [J]. Plant Magazine，(3)：2. [李珍贞，邬辉平，1988. 2，4-D 与罗汉果单性结实[J]. 植物杂志，(3)：2.]

LIN BY，LI M，LIN DQ，2006. Study of the tomato fruit specific gene cloning and functional *2A11* [J]. Agricultural Science，22 (10)：62-66. [林炳英，李梅，林德钦等，2006. 番茄果实特异性启动子 *2A11* 的基因克隆及功能研究[J]. 农业生物技术科学，22(10)：62-66.]

LIU D， LI Q， LI G， 2008. IAA synthesis key gene *iaaM* research progress [J]. Biotechnology，18(2)：87-90. [刘迪，李群，李冠，2008. IAA 合成关键基因 *iaaM* 研究

进展[J]. 生物技术，18(2)：87-90.]

MAO ZZH，YU QJ，ZHEN W，2002. Fruit specific promoter driven expression of *ipt* gene in tomato and its influence on the development of tomato fruit [J]. Science Bulletin，47(6)：444-448. [毛自朝，于秋菊，甄伟等，2002. 果实专一性启动子驱动 *ipt* 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响[J]. 科学通报，47(6)：444-448.]

National Pharmacopoeia Committee，2015. Pharmacopoeia of the people's Republic of China：2015 edition [M]. Beijing：China Medical Science and Technology Press：212. [国家药典委员会，2015.中华人民共和国药典：2015 年版[M]. 北京：中国医药科技出版社：212.]

PANDOLFINI T，ROTINO GL，CAMERINI S，et al，2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level：high quality parthenocarpic fruits inindustrial tomatoes [J]. BMC Biotechnol，2：1-11.

PICONE G，2011. Unsupervised principal component analysis of NMR metabolic profiles for the assessment of substantial equivalence of transgenic grapes (vitis vinifera) [J]. J Agr Food Chem，59(17)：9271-9279.

QIN YY，LI XH，2012. Research progress in pharmacology and toxicology of Fructus grosvenori [J]. Modern Medicine and Health，28(18)：2794-2796. [秦莹莹，李啸红，2012. 罗汉果甜苷的药理毒理研究进展[J]. 现代医药卫生，28(18)：2794-2796.]

ROTINO GL，2005. Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: Seedlessness and fruit quality [J]. BMC Biotechnol，5.

ROTINO GL，PERRI E，ZOTTINI M，et al，1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants [J]. Nat Biotechnol，15：1398-1401.

SHABTAI S S Y K，2007. Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of *rolB* in processing tomatoes [J]. Theor Appl Genet，114(7)：1203-1209.

TAO L，2013. Establishment of high frequency regeneration system of loquat and Study on *iaaM* gene of parthenogenetic seed [D]. Yaan：Sichuan Agricultural Uniersity：7-12. [陶炼，2013. 枇杷高频再生体系的建立及转单性结实 *iaaM* 基因的研究[D]. 雅安：四川农业大学:7-12.]

VAN HAAREN M J，CATHERINE M H，1991. Strong negative and positive regulatory elements contribute to the high-level fruit specific expression of tomato *2A11* gene [J]. Plant Mol Biol，17：615-630.

WANG L，2007. Agrobacterium mediated *iaaM* gene to create parthenocarpic Physalis germplasm resources [D]. Haerbin：Northeast Agricultural University：5-12. [王蕾. 2007. 农杆菌介导 *iaaM* 基因创造单性结实酸浆种质资源[D]. 哈尔滨：东北农业大学:5-12]

YAN L Y，2010. Inheritance of parthenocarpy in monoecious cucumber (Cucumis sativus L.) under different eco-environments [J]. Chinese Journal of Applied Ecology，21(1)：61-66.

ZHANG W，WANG B，ZHOU L，et al.，2014. The research progress on the composition and pharmacology of Fructus grosvenori [J]. Food Industry Science and Technology，35(12)：393-397. [张维，王斌，周丽等，2014. 罗汉果成分及药理研究进展[J]. 食品工业科技，35(12)：393-397.]